

# **PROCESS FOR THE PRODUCTION OF MANNITOL BY IMMOBILIZED MICRO-ORGANISMS**

Publication number: JP2002520066 (T)

Publication date: 2002-07-09

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- International: A23K1/16; A23L1/03; C12N1/10; C12N1/08; C12P7/18; C12R1/01; A23K1/18; A23L1/03; C12N1/10; C12P7/18; (IPC1-7); A23K1/18; A23L1/03; C12N1/10; C12P7/18; C12P7/18; C12P7/18; C12P7/18; C12P7/18; C12R1/01; C12R1/225; C12R1/66; C12R1/72

- European: C12N1/08; C12P7/18

Application number: JP20000560278T 19990629

Priority number(s): FI19980001615 19980715; WO1999F100573 19990629

Also published as:

 WO0004181 (A1)

 US6602691 (B1)

 EP1097237 (A1)

 AU4912799 (A)

Abstract not available for JP 2002520066 (T)

Abstract of corresponding document: WO 0004181 (A1)

The invention relates to the production of mannitol by bioconversion with the aid of immobilized micro-organisms as well as to the use of the mannitol and by-products formed in the conversion process. In said process a solution containing a substrate convertible into mannitol is fed into contact with solid carrier particles containing viable mannitol-forming micro-organism cells immobilized in and/or on said particles. The solution is reconditioned between successive conversion steps in order to provide conversion of a major portion of said substrate into mannitol.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-520066

(P2002-520066A)

(43) 公表日 平成14年7月9日 (2002.7.9)

(51) Int.Cl. <sup>1</sup>	識別記号	F I	チーコード* (参考)
C 1 2 P 7/18		C 1 2 P 7/18	2 B 1 5 0
A 2 3 K 1/16	3 0 3	A 2 3 K 1/16	3 0 3 D 4 B 0 3 3
A 2 3 L 1/03		A 2 3 L 1/03	4 B 0 3 5
C 1 2 N 11/00		C 1 2 N 11/00	4 B 0 6 4
// (C 1 2 P 7/18)		(C 1 2 P 7/18)	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-560278(P2000-560278)  
 (86) (22) 出願日 平成11年6月29日 (1999.6.29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成13年1月15日 (2001.1.15)  
 (86) 国際出願番号 P C T / F I 9 9 / 0 0 5 7 3  
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 0 4 1 8 1  
 (87) 国際公開日 平成12年1月27日 (2000.1.27)  
 (31) 優先権主張番号 9 8 1 6 1 5  
 (32) 優先日 平成10年7月15日 (1998.7.15)  
 (33) 優先権主張国 フィンランド (F I)

(71) 出願人 キシロフィン オイ  
 フィンランド国 エフアイエヌ-48101  
 コトカ ビー. オー. ボックス 213  
 (72) 発明者 ヘイキ オジャモ  
 フィンランド国, エフ アイ エヌ-  
 08150 ロージャ, ベイジョランティ 15  
 (72) 発明者 ハンヌ コイピコ  
 フィンランド国, エフ アイ エヌ-  
 02460 カントピク, ラジャカルリオ エ  
 フ  
 (74) 代理人 弁理士 専 経夫 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固定化微生物によるマンニトールの製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 本発明は、固定化微生物の助力による生変換によるマンニトールの製造、ならびに該変換方法において形成されたマンニトールおよび副産物の使用に関する。前記方法において、マンニトールに変換可能な基質を含む溶液を、粒子中および/または上に固定化された生存可能なマンニトール形成微生物細胞を含む固体担体粒子に接触させるように供給する。連続的な変換段階の間に前記溶液をリコンディショニングし、前記基質の大部分をマンニトールに変換する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 マンニトールに変換可能な基質をマンニトールに変換するのに適当な条件下で、前記基質を含む溶液を供給し、粒子中および／または上に固定化された生存可能なマンニトール形成微生物細胞を含む担体粒子に接触させること、

前記基質の大部分をマンニトールに変換するために、連続的な変換段階の間に前記溶液をリコンディショニングすること、ならびに

マンニトールおよび／または変換副産物を回収すること  
を特徴とする、固定化微生物の助力による生変換によりマンニトールを製造する方法。

【請求項2】 前記溶液の前記リコンディショニングが、連続的なpH、温度、供給速度、基質含有量、補基質含有量、栄養素供給または圧力の調整、変換生成物または他の固体もしくは液体成分の除去、あるいは前述のいずれかの組み合わせからなることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記リコンディショニングが前記溶液の一部で行われるか、または前記溶液の種々の部が種々のリコンディショニング段階を受けることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 前記基質がフルクトースからなることを特徴とする請求項1ないし3記載の方法。

【請求項5】 前記変換が、前記溶液中のフルクトースの少なくとも70%、好ましくは80ないし90%またはそれより多くがマンニトールに変換されるまで行われることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記担体粒子が多孔性、実質的に非圧縮性材料であることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項7】 前記方法が、前記担体により充填されたカラムの1本もしくはそれより多くにおいて連続的に行われる連続的な変換方法であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項8】 前記溶液が前記カラムの1本もしくはそれより多くを通して再循環されることを特徴とする請求項6または7記載の方法。

【請求項9】 前記溶液が一連の前記カラムを通して連続的に供給されることを特徴とする請求項6または7記載の方法。

【請求項10】 前記担体が、多孔性ガラスビーズ、多孔性シリケートビーズまたは活性炭のような不活性材料からなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項11】 前記担体が、実質的に非圧縮性の多孔性粒子状固体材料の形態の弱塩基性アニオン交換基材、好ましくはポリスチレンとの凝集により接着結合したジエチルアミノエチル (DEAE) 変性セルロースを含む弱塩基性アニオン交換体からなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項12】 前記微生物が、ロイコノストク シュードメセンテロイズ (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)、アスペルギルス カンジダス (*Aspergillus candidus*)、ザイゴサッカロマイセス ロウクシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*)、カンジダ ベルサチリス (*Candida versatilis*)、ラクトバシルス フェルメンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバシルス セロビオサス (*Lactobacillus cellobiosus*)、ラクトバシルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバシルス ブチネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ロイコノストク メセンテロイズ (*Leuconostoc mesenteroides*) およびロイコノストク オエノス (*Leuconostoc oenos*) からなる群から選択されることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項13】 前記微生物がロイコノストク シュードメセンテロイズ (*Leuconostoc pseudomesenteroides*) (ATCC 12291) であることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項14】 前記リコンディショニングが、前記溶液のpHを約4以上の値まで、好ましくはpH4.5および6.5の間に、最も好ましくは約pH5まで調整することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項15】 アルカリヒドロキシドまたはアンモニウムヒドロキシドのような塩基を添加することにより、あるいは緩衝物質を添加することにより前記溶液のpHが調整されることを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項16】 変換の間に形成された酸を除去することにより前記溶液のpHが調整されることを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項17】 前記溶液の圧力を減少することにより、変換の間に生成された二酸化炭素の溶解により形成されたカルボン酸を除去することの特徴とする請求項16記載の方法。

【請求項18】 前記コンディショニングが、前記溶液の温度を約20ないし35℃、好ましくは25ないし30℃の値まで調整することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項19】 前記コンディショニングが、前記溶液の体積流量速度を時間当たり約2ないし20ベッド容積、好ましくは時間当たり約10ないし20ベッド容積の値まで調整することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項20】 前記コンディショニングが、前記溶液の基質フルクトース含有量を約7ないし200g/l、好ましくは約15ないし160g/l、最も好ましくは約50ないし150g/lまで調整することからなることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項21】 前記コンディショニングが、前記溶液の補基質含有量を約4ないし100g/l、好ましくは約8ないし80g/l、最も好ましくは約25ないし75g/lまで調整することからなることを特徴とする請求項20記載の方法。

【請求項22】 前記コンディショニングが、固定化微生物細胞の微生物活性を断続的に回復させるために前記溶液に栄養素を添加することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項23】 前記栄養素がイースト抽出物、トリプトン、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、マグネシウムスulfate、マンガンスulfateおよびそれらの混合物から選択されることを特徴とする請求項20または21記載の方法。

【請求項24】 前記コンディショニングが、連続的な変換段階の間にマニトールを回収することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項25】 前記リコンディショニングが、最終マンニトール回収後に母液に残存する基質をいずれも前記溶液に戻すことからなることを特徴とする請求項24記載の方法。

【請求項26】 前記リコンディショニングが、クロマトグラフィーおよび／またはイオン交換により前記溶液から酸を回収することからなることを特徴とする請求項24記載の方法。

【請求項27】 前記リコンディショニングが、前記母液または前記回収された酸の少なくとも一部を前記溶液に戻すことからなることを特徴とする請求項23または25記載の方法。

【請求項28】 前記リコンディショニングが、ろ過、沈殿、抽出、メンブレンフィルター、電気透析および分別蒸留から選択された方法の一種またはそれより多くにより、前記溶液に含まれる固体または液体成分を除去することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項29】 前記リコンディショニングが、前記変換において10g／1h以上の、好ましくは30および40g／1hの間のマンニトールの容積生成力をもたらすようにモニターされることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項30】 前記カラムにおけるマンニトールの容積生成力が予め決められた境界値まで減少するまで、前記溶液が前記カラムを通して再循環させることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項31】 前記溶液が補基質としてグルコースのような同化性ヘキソース糖、またはヘキソース糖に加水分解可能なオリゴもしくはポリサッカリド、あるいはそれらの混合物を含むことを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項32】 前記供給溶液がフルクトースおよびグルコースの混合物を含むことを特徴とする請求項31記載の方法。

【請求項33】 前記供給溶液が異性化グルコース、転化糖蜜、ビートまたはサトウキビ糖蜜、それらの希薄もしくは濃厚ジュースあるいはフラクションからなることを特徴とする請求項32記載の方法。

【請求項34】 前記溶液におけるグルコースが、該方法において、同時に

、または別々に、好ましくは連続的に、酵素的に異性化されることを特徴とする請求項32記載の方法。

【請求項35】 前記溶液が、マンニトールに変換可能な前記基質としてグルコースまたはマンノースを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項36】 前記担体が、微生物細胞の除去、洗浄および新しい生存可能な微生物細胞による再装填により再生されることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項37】 マンニトールが、最終変換された溶液から結晶化により回収されることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項38】 マンニトール分離後、母液に含まれる乳酸および／または酢酸をクロマトグラフィーおよび／またはイオン交換により回収することを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項39】 請求項1ないし38のいずれか一つに記載の方法により得られる母液を、食品添加剤、動物飼料または動物飼料添加剤として使用すること

。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、固定化微生物による生変換によるマンニトールの製造、特に生存可能な固定化マンニトール形成微生物によるマンニトール生成基質の生変換に関する。本発明はまた、該変換方法において形成されたマンニトールおよび副産物の使用にも関する。

## 【0002】

マンニトールは、いくつかの工業分野で広い用途を有する六炭糖アルコールである。食品用途の例は、甘味料、抗凝結および自由流れ剤である。医薬的用途は、固体および液体に対する賦形剤および希釈剤、浸透利尿剤、ならびに手術における保護剤である。マンニトールはまた、樹脂および可塑剤を製造するためにも使用される。

## 【0003】

少量のマンニトールは、いくつかの果物および野菜に見られる。ある種の藻類およびキノコ類は非常に高濃度のマンニトールを含む。マンニトールはマンナおよび海草から回収されている。現在は、フルクトースまたはグルコース／フルクトース混合物、例えば転化糖の触媒水素添加により、マンニトールが工業的に製造されている。ラネーニッケルが触媒として使用される。この方法の不利な点では、フルクトースの約半分のみがマンニトールに変換されるということである。他の半分は、全グルコースと同様にソルビトールとなる。マンニトールはソルビトールよりも、はるかに水に不溶性であり、従ってこれら二種の化合物の分離には結晶化が使用される。触媒としてラネーニッケルを使用しているので、水素添加される材料は触媒による毒作用を避けるために、完全に純粋でなければならない。

## 【0004】

マンニトールは、水素添加によりマンノースおよびグルコースからも製造され得る。いくつかの微生物はマンニトールを生成するものとして公知である。バクテリアではヘテロ発酵バクテリア、ロイコノストク メセンテロイズ (*Leuconostoc mesenteroides*) が最も効果的であるように思われる。Soetaert W., Med. Fa



c. Landbouw. Rijksuniv. Gent, (1990) 55/4:1549-52 には、遊離細胞による上記発酵法ではフルクトースからのマンニトール収率80ないし90%が提供されると記載されている。後に、Soetaert W. 等, Agro-Food Industry Hi-Tech, Jan/Feb 1995: 41-45 には、突然変異体株を使用した供給バッチ法において、遊離細胞により94%までの収率が示されている。この供給バッチ発酵では、細胞成長を可能にする栄養素を非常に高い濃度で含む培養液において、3.5 g/l h の平均容積生成力が得られた。このような系における製造に関して、細胞成長は不可欠である。

#### 【0005】

Soetaert 等, Bioorganic Chemistry in Healthcare and Technology, 編集者 Pandit U.K. および Alderweireldt F.C., Plenum Press, New York, 1991 でも、ポリウレタンに固定化された細胞での、連続的バイオリアクターを適用するように試されているが、結果は乏しく、フルクトースからのマンニトール収率は約50%のみを達成した。上記の1995年の文献でSoetaert 等は、これはマンニトールへの変換酵素、フルクトースデヒドロゲナーゼへのフルクトースの親和性の低さにより起こるものであると説明している。Soetaert によると、収率の低さは固定化バイオリアクター使用の結果である。

#### 【0006】

Araya等による欧州特許第0683152号(1991)には、ラクトバシルス スペシー、(Lactobacillus sp.) B001株を使用していた同様の遊離細胞法が記載されている。これによりフルクトースからのマンニトール収率60%が得られる。彼らはまた、培養液からの酢酸および乳酸の分離についても請求している。

ヒデユキ等による特開昭62-239995号(1987)には、マンニトール製造に、例えばラクトバシルス プレビス (Lactobacillus brevis) IF O 3960株およびエル・メセンテロイズ(L. mesenteroides) IF O 3426株の遊離細胞が使用される方法が開示されている。

#### 【0007】

Yun 等, Biotechnol. Lett. (1996), 18: 1145-1150 には、もう一種の乳酸バ

クテリア ラクトバシルス スペシー、(*Lactobacillus* sp.) KY-107株の遊離細胞による発酵マンニトール製造に関するデータがいくつか示されている。グルコース添加は不必要であり、フルクトースからのマンニトール収率は71%である。他の細胞外生成物の形成は示されていない。平均容積生成力は該結果から算出され得、約0.9 g/l hである。

オニシ等, *Biotechnol. Bioeng.*, (1970), 12: 913-920 には、トルロプシス ベルサチリス (*Trulopsis versatilis*) 株の遊離細胞によりグリセロールからマンニトールを収率50%で得る方法が記載されている。

#### 【0008】

いくつかの糸状菌類(カビ類)もまたグルコースからマンニトールを生成する。Hendriksen 等, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, (1988), 43: 223-228 によると、これらの最良のものはアスペルギルス カンジダス(*Aspergillus candidus*)であり、グルコースからのマンニトール収率50%が得られる。イーストおよび糸状菌類による生成はバクテリアによるものよりも低い容積生成力を与える。全レ出入口は遊離細胞によるものである。

#### 【0009】

糖類のマンニトールへの変換に関する従来技術の生命工学的方法是完全に満足できるものではなく、従って工業的製造は未だ主に水素添加をベースとしている。遊離のマンニトール形成微生物を使用する生変換は、大スケールの製造に関して完全に適当なものではなく、今までのところ、固定化系による系は適当な変換収率をもたらすものではない。従来技術の系の容積生成力は低く、不経済な作業を導く。

従って、工業的に許容される方法を提供するために、フルクトースおよび他の基質のマンニトールへの生変換に関して、改良する必要があるが残っている。

#### 【0010】

従って、本発明の目的は、基質をマンニトールに変換することに関する従来技術の不利な点を克服すること、およびマンニトールの製造に関して技術的に実行可能な生命工学的方法を提供することである。

また、本発明の目的は、固体担体に固定化された生存可能な微生物により適当

な基質をマンニトールに変換する方法を提供することである。

本発明の更なる目的は、収率を高めるために変換の間、溶液がリコンディショニングされる充填されたカラムにおいて、基質をマンニトールに変換する連続的な方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、マンニトールに変換可能な基質を含む溶液が連続的にリコンディショニングされ、固定化微生物による変換に関して最適な条件がもたらされる方法を提供することである。

#### 【0011】

また、本発明の目的は、低い流れ抵抗を有し、充填されたカラムを通る基質溶液の流れにおいて低い落下圧力を有する前記カラムにおいて、マンニトールを製造する方法を提供することである。

また、本発明の目的は、カラムを通して許容され得る流速を有する充填されたカラムを利用する方法を提供することである。

また、本発明の目的は、変換のためにグルコースのような補基質を本質的に含むフルクトース含有溶液からマンニトールを製造することに関する。

本発明の目的は、更に、比較的高い容積生産力でマンニトールを製造する生命工学的方法を提供することである。

#### 【0012】

驚くべきことに、従来信じられてきたことに反して、担体中および／または上に固定化されている微生物により、マンニトールが有利に製造され得ることが見出された。

本発明は添付された請求項に定義されており、その内容は本文に参考に含まれている。

#### 【0013】

従って本発明は、固定化微生物による生変換によりマンニトールを製造する方法に関する。前記方法は、マンニトールに変換可能な基質をマンニトールに変換するために適当な条件下で、前記基質を含む溶液を供給し、粒子中および／または上に固定化された生存可能なマンニトール形成微生物細胞を含む固体担体粒子に接触させること、前記基質の大部分をマンニトールに変換するために、連続的

な変換段階の間に前記溶液をリコンディショニングすること、ならびにマンニトールおよび／または変換副産物を回収することの段階からなる。

好ましい基質はフルクトースである。好ましい生変換において、溶液はグルコースのような補基質も含む。

#### 【0014】

上記溶液のリコンディショニングは、好ましくは、条件パラメーターの一種もしくはそれより多くを調整することにより連続的な方法により行われる。連続的なリコンディショニングは、好ましくは生変換の明確な段階の間に行われる。

本発明によると、溶液は、好ましくは固定化微生物のベッドを通して供給される。微生物ベッドは充填されたカラムに含まれ得るか、あるいは攪拌されたリアクター中に配置されても良い。本発明の好ましい態様において、溶液は充填されたカラムを通して再循環されて、溶液はベッドから排出されるとリコンディショニングされ、次の連続的な生変換のために最適化される。

#### 【0015】

供給溶液は、好ましくは時間および変換により変化する加工パラメーターの調整により連続的にリコンディショニングされる。本発明によるリコンディショニングは、該方法の変換速度および／または変換収率を改良する。

本発明の好ましい態様によって、溶液のpHを断続的に調整することにより、基質溶液は連続的にリコンディショニングされる。好ましくは実際の微生物ベッド以外の所で、ベッドを通して溶液を再循環させることにより、そして再循環の間にpHを調整することにより、pHは調整される。あるいはpHは、いくつかのベッドを直列で、または並列で有する系において、ベッドの間で調整され得る。ベッドは、好ましくはカラム1本またはそれより多くに含まれる。溶液は、そのようなカラムを通して比較的高い流速で供給されて良い。

#### 【0016】

本発明の他の態様において、溶液は、変換における微生物のいくつかにより使用されるフルクトースのようなマンニトール生成基質、またはグルコースのような補基質の濃度を調整することにより、連続的にリコンディショニングされる。上記溶液のリコンディショニングは、前記方法を最適条件で連続的に遂行させる

。また、どちらかが低濃度である基質または補基質を有する溶液はリコンディショニングされて最適条件の溶液とされるので、供給溶液の選択を自由なものとする。

再循環の間および／またはベッドもしくはカラムの間で供給溶液の温度を連続的に調整することも有利であることが見出された。溶液の温度は、問題の微生物の最適温度内である値に調整されるべきである。

#### 【0017】

本発明によって、かなり高い供給速度で進めることが有利であることが見出され、それは流れに対して少ない抵抗のみを提供する実質的に非圧縮性の担体に固定化された微生物を有する充填されたカラムの使用により可能である。しかしながら、供給速度は、カラムの間で、または例えば1本のカラムから2本へ流れを分割することにより調整されても良い。

好ましくは連続的な方法で、供給溶液における栄養素のリコンディショニングは本発明による使用法では、一方では変換に必要な基本的栄養素の最適濃度をもたらし、他方では固定化微生物を、増加した、および供給された栄養素供給により、増加した成長の連続的な相をもたらす条件をそれらに受けさせることにより、断続的な回復が供給される。

#### 【0018】

前記方法において、いくつかの変換生成物は変換速度の低下を起こしやすい。溶液は、好ましくは連続的に、例えばろ過、結晶化、クロマトグラフィー、イオン交換、圧力の減少、試薬添加による中性化等のような種々の方法による、そのような生成物の除去により連続的にリコンディショニングされる。

多くの場合、上記に論じられたリコンディショニングの二種もしくはそれより多くの組み合わせにより、変換に最適な所望の条件が提供される。流れの一部をリコンディショニング段階を通す方向に導くことも可能であるし、他の供給部分はコンディショニングを受けなくてもよい。流れは、生変換の間の相において、種々のリコンディショニング段階の間に分割されてもよい。

#### 【0019】

本発明によると、目的は、コンディショニングされていない状態と比較して、

マンニトールの交換収率を増加させるのに充分な量で前記リコンディショニングを行うことである。好ましくは、連続的なコンディショニングが行われ、供給フルクトースの少なくとも70%、好ましくは80ないし90%もしくはそれより多くがマンニトールに変換される。

本発明の好ましい態様によると、供給溶液は微生物のベッドを通して再循環され、系のマンニトール収率および容積生成力を増加させる。供給溶液は、微生物のベッドのいくつかを通して連続的に供給されてもよい。前記方法は、好ましくは連続的な変換として、固定化微生物を含む担体で充填されたカラムの1本もしくはそれより多くにおいて行われる。

#### 【0020】

本発明による固定化系は、高濃度の微生物の使用を可能とし、非常に低い濃度の栄養素を有する基質を含む単純な溶液の供給および同じ固定化微生物接種材料による長期にわたる定常的な製造を可能とする。これらの全ては、基質(一般的にフルクトース)からの高いマンニトール収率をもたらす。50%以上、および80ないし90%もしくはそれより高い収率が得られる。前記系は非常に高い容積生成力(約10g/lh以上、および30ないし40g/lhまで)および一回の細胞装填による定常的な製造を提供する。

粗製変換生成物は基本的にマンニトールおよび乳酸および酢酸のような酸を含み、粗製生成物に関して細胞分離は必要ではない。従って、前記方法においては、例外的に純粋な粗製生成物が形成される。マンニトールに変換される基質は、マンニトール回収段階の後、基質濃度を連続的に増加させ、それにより変換収率を増加させるために再循環されてよい。補基質も同様に前記方法において再循環されてよい。同様に、連続的に変換の無菌状態を向上させるために、変換において生成された酸部分を回収段階から再循環してよい。

#### 【0021】

回収におけるマンニトール収率は、ほとんどのマンニトールが、母液から分離された後に結晶後の母液を工程に連続的に戻すことにより増加し得る。従って、母液に残存するマンニトールは、変換において生成されるマンニトールに添加されるであろう。

本方法の実行に有用である担体は、好ましくは非圧縮性材料であるべきである。それは、多孔性ガラスビーズ、多孔性シリケートビーズ、粒子状活性炭、または固体酸性もしくは塩基性イオン交換材料のような不活性材料からなっていよい。特に良好な結果は、実質的に非圧縮性、多孔性表面の粒子状固体材料の形態の弱塩基性アニオン交換基材により、市販品のスケールで得られた。適当なカチオン交換体は、ポリスチレンとの凝集により接着結合した塩基性ジエチルアミノエチル (DEAE) 変性セルロースのマイクロファイバーまたはマイクロ粒子からなり、酸性化GDC担体 (例えば、Genenocor International Oyにより製造されている登録商標Spezyme GDC) のような粒子を形成する。

強酸または塩基特性を有するイオン交換体は担体材料として不適當である。

#### 【0022】

担体上または中に固定化された微生物が、ペントースリン酸経路を通してのみ糖を代謝させ、マンニトールデヒドロゲナーゼ活性を示し、マンニトールの他に主な還元生成物、例えばエタノールを生成せず、そして発酵微生物であることが好ましい。いくつかのヘテロ発酵乳酸バクテリアが、そのような微生物の例である。適当な微生物については、ロイコノストク シュードメセンテロイズ (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)、アスペルギルス カンジダス (*Aspergillus candidus*)、ザイゴサッカロマイセス ロウクシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*)、カンジダ ベルサチリス (*Candida versatilis*)、ラクトバシルス フェルメンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバシルス セロビオサス (*Lactobacillus cellobiosus*)、ラクトバシルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバシルス ブチネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ロイコノストク メセンテロイズ (*Leuconostoc mesenteroides*) およびロイコノストク オエノス (*Leuconostoc oenos*) があげられる。好ましい微生物はロイコノストク シュードメセンテロイズ (*Leuconostoc pseudomesenteroides*) (ATCC 12291) である。

しかしながら、本発明はこれらの微生物および同様の活性を有する他の微生物、ならびにそのような微生物から、例えば組み換え技術により誘導された微生物を前記方法に使用してもよい。

#### 【0023】

ペントースリン酸経路を通るヘキソース糖の代謝は、ヘキソース1モルに対して、二還元当量(NAD(P)H)および1モルのペントース-5-リン酸を生成する。1モルのペントース-5-リン酸から、乳酸バクテリアにより、1モルの乳酸および1モルの酢酸が生成される。後者の経路では、還元当量の正味の消費または生成がない。従って、微生物は余分の還元当量を消費するために、還元されるべき基質を必要とする。それが、好んでマンニトールに変換される基質である。本方法に使用されるほとんどの微生物は発酵性であり、従って酸素転移を必要としない。

いずれかの同化性ヘキソース糖、またはそのようなヘキソース糖に加水分解可能なオリゴ-もしくはポリ-サッカリド(例えばスクロース、ラクトース、マルトース、スターチ、スターチもしくはセルロース加水分解産物、セロピオース、セルロース)あるいはこれらを含む複合材料を補基質として使用できる。好ましい基質はマンニトールに変換可能なフルクトースである。いくつかの場合、本発明に従って、フルクトースと同等の方法で基質としてマンノースが作用し、マンノースは供給溶液に含まれてよい。

#### 【0024】

従って、適当な供給溶液はフルクトースおよびグルコースの混合物、転化糖蜜および/または異性化グルコースを含む。供給溶液中のグルコースは、本方法において、分離ループまたは同様の装置において、同時に、もしくは別々に、好ましくは連続的に酵素的に異性化されてよい。供給溶液は、ビートまたはサトウキビ糖蜜あるいはそれらのフラクションからなってもよい。希薄もしくは濃厚ジュースあるいは、1回目、2回目または3回目の糖結晶化後の、糖製造からの流出物からなってもよい。実際、物質を含む転化スクロースのいずれも供給材料として使用されてよく、それは次いでリコンディショニングされ、出発材料から最適なマンニトール収率を得るために適当な溶液を提供する。

前記変換方法は、マンニトール、乳酸および酢酸のような酸ならびにいずれかの未反応成分を含む粗製生成物を生じさせる。必要であるか所望である場合、粗製生成物は、一つもしくはいくつかの生成物に分離されてよい。これらの製品は上記の通り、変換工程に再循環されて供給溶液に連続的なリコンディショニング



を提供することができるか、またはそれらは回収されて種々の分離目的のために使用されてよい。

### 【0025】

回収段階は一般的に、以下の限定されない操作の一覧から選択された段階の一種もしくはそれより多くを含む。

粗製生成物の濃縮；

マンニトールの結晶化；

粗製生成物からの種々の生成物のクロマトグラフィーによる分離；

それら生成物の濃縮；

分離されたマンニトールの結晶化；

マンニトール結晶化母液からの生成物の分離；および

酢酸および／または乳酸の蒸留。

マンニトール分離後の母液には、乳酸および／または酢酸が含まれており、本発明により、この母液は動物飼料または食品もしくは飼料添加剤、例えば防腐剤として使用され得る。

### 【0026】

上述のSoetaert等(1995)の記載では、いくつかのマンニトールデヒドロゲナーゼのフルクトースに対する親和性は、やや低いということが開示されている。これは、Km値(エル・シュードメセンテロイズ(L. pseudomesenteroides))については、フルクトースについて約7 g/lに近い、それ以下の、減少された容積生成力をもたらす。いずれのフルクトースも損失させずに、これを避けるために、本発明は好ましくは粗製生成物に対する、またはマンニトール結晶化母液に対するクロマトグラフィー分離段階、および変換段階における連続的なリコンディショニングのための分離されたフルクトースのリサイクルを含む。この方法は、低い相互親和性を有する酵素および基質の対のいずれに対しても使用することができる。

### 【0027】

最適変換条件は使用されている微生物に依存する。特に培養液のpHおよび加工温度は重要なパラメーターであり、好ましくは、その微生物に適する値まで連

続的に調整されるべきである。酸が生成された場合、pHが非常に減少することのない方法で補基質消費を調整することにより、pHを調整することができる。あるいは供給溶液は、相溶性の緩衝剤により緩衝されてよく、またはpHは水酸化ナトリウムのような塩基の数回の添加により調整されてよい。上記溶液がベッド以外の所で循環されている場合、再循環の間に一つのベッドもしくはカラムにおいて、または二つの連続的なベッドもしくはカラムの間でのどちらかで、塩基を連続して供給溶液に添加してもよい。pHは、溶液からの酸副産物の連続的除去によっても調整され得る。

#### 【0028】

変換により一般的に、副産物として二酸化炭素が生成される。二酸化炭素はベッドまたはカラムの上部に自由に上昇され得るか、カラムに圧力をかけることにより溶液中に残り得る。CO<sub>2</sub>が放出した場合、カラムの流れパターンをCO<sub>2</sub>ガスが混乱させることを防止するために、カラムは、好ましくは圧力をかけられる。圧力がカラムにかけられる場合、カラムの間で、または再循環の間で圧力を開放することにより、供給溶液のpHは連続的に調整されることもできる。二酸化炭素ガスは自由に大気中に漏れるので、これは分解されたカルボン酸の量を減少する。

#### 【0029】

本発明に関して、使用されている微生物が固体担体中および／または上に固定化されていることは非常に重要である。Soetaert等(1991)は担体としてポリウレタンを使用し、失望的な結果を得た。驚くべきことに、本発明に従う操作を行う場合、固定化細胞により非常に良好な結果を達成することが可能であることが見出された。

固定化微生物細胞のベッドは、供給および流出のための出入口を有するいずれかの容器に含まれてよい。ベッドの外側への溶液の循環は、温度調整、および好ましくは攪拌を可能にし、そして供給、流出およびpH調整剤、栄養素等のような化合物の添加のための出入口を有する。好ましくは容器はカラムである。いくつかのカラムが直列に、および／または並列に使用されてよい。

#### 【0030】

本発明は、本発明の好ましい態様の参考により、本文に詳細に記載されている。しかしながらこの記載は、この特定な態様に本発明を限定するようないずれかの方法に向けられるものではないと理解されるべきである。

生物生成は第一に、効率のよい細胞マス生成を可能にする液体培地において成長する。この接種材料生成相において、十分な栄養素が培地に添加され、適当な細胞成長が可能となる。

固定化に関して、接種材料は製造容器において担体材料のベッドを通して循環されるか、または担体材料が接種材料に添加され、細胞が材料に接合し、その後材料が容器に移動される。

製造段階において、基質および補基質を含む供給溶液は細胞マスー担体ベッドを通して再循環されるか、または連続するベッドを通して供給される。

#### 【0031】

製造容器は好ましくは、非圧縮性担体上に固定化された微生物により充填されたカラムからなる。前記系は再循環系を有する単一のベッドからなるか、または直列で、もしくは並列で、カラムの2本もしくはそれより多くからなってもよい。カラムは例えば、カラムの間に位置するpH調整化合物、基質および補基質、栄養素等のための供給出入口を伴って、各々の上に積み上げてよい。

実質的に非圧縮性の担体をカラムに使用する場合、カラムはかなり高くてもよく、例えば1mもしくはそれより高くても、まだ許容され得るレベルの流速が提供される。溶液の流れ方向は下方向または上方向のいずれであってもよい。

体積流量速度は、好ましくは、生変換における酸の生成が、問題のベッドにおけるマンニトール生成が禁止されるレベルに達しないような速度に維持される。最適なマンニトール濃度に達するために、供給は1時間当たり2ないし20ベッド容積、好ましくは1時間当たり約10ないし20ベッド容積の速度で行われる。

#### 【0032】

溶液のpHは連続的に調整され、使用されている特定微生物に対する最適値まで供給溶液をリコンディショニングする。例えばpHはNaOH、NH<sub>4</sub>(OH)、KOH等のような塩基を添加することにより調整され得るが、pH調整の他

の方法は上記されている。pHは一般的に約4および7の間のレベルまで、多くの場合、4.5および6.5の間まで、好ましくは約5までリコンディショニングされる。

溶液は、ベッドにおける生変換段階からpH調整が行われる中間容器に向けられてよく、またはpH調整は循環パイプにおいて、もしくは一つのカラムからもう一つに導かれるパイプにおいて行われてよい。

溶液の温度は連続的に調整されてよく、変換に関する最適条件に近いものが提供される。約20ないし35℃、好ましくは25ないし30℃の値に溶液の温度を調整することが有利であると見出された。

#### 【0033】

代表的な基質（フルクトース）濃度は、7ないし200g/l、好ましくは15ないし160g/l、最も好ましくは約50ないし150g/lであり、相当する補基質（グルコース）濃度は、4ないし100g/l、好ましくは8ないし80g/l、最も好ましくは約25ないし75g/lである。フルクトース濃度が問題の微生物のKm値より低くなるまで減少した場合、変換速度は非常に低下する。従って、転化相の間に連続的にフルクトースを添加することにより、フルクトースのレベルを明白にKm値以上にするために、溶液はリコンディショニングされるべきである。

実際の生変換相の間では休止状態の細胞マスを使うのが有利である。と言うのは、通常の供給溶液において非常に低い栄養素濃度が要求されるからである。代表的には、1ないし4g/lの濃度のイースト抽出物および/またはトリプトンがベッド以外の所で溶液に連続的に供給される。細胞マスが担体により容器中に残されており、マンニトール変換相には細胞成長を必要としないため、この低栄養レベルが可能である。変換速度はベッド中の活性細胞マスの全量に依存する。連続的な低レベルの栄養素添加は、断続的に細胞の微生物活性を回復させる。

#### 【0034】

変換が進むと、ベッド中の生存可能な細胞の不足により、ベッドの有効性は徐々に低下する。従って微生物を成長させ、担体における微生物密度を増加させる

ために、増加した量の栄養素を溶液へ好ましく連続的に供給することにより、ベッドにおける細胞マスの回復が行われる。栄養素は一般的にイースト抽出物、トリプトン、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、マグネシウムスルフェートおよび／またはマンガンスルフェートかなる。

好ましくは同じ細胞マスの装填により、製造および回復の交代サイクルが行われる。容積生成力が境界値以下まで減少した場合、供給溶液への栄養素の添加により回復相が開始する。容積生成力に関して、より高い境界値に達するまで、連続的な栄養素添加は維持される。容積生成力は、例えばpH調整剤の消費速度から確立され得る。

#### 【0035】

溶液のリコンディショニングは、前記溶液から固体または液体成分を除去することにより行われてもよい。それらの選択された成分を除去するために、溶液は、ろ過、沈殿、希釈、メンブレンフィルター、電気透析および分別蒸留等を受け てよい。

担体材料が耐久性および非圧縮性構造であるため、細胞マスが、回復および成長がもはや充分な変換速度を提供しない段階に達した後でも、再利用することができる。特に、上記DEAE変性セルロース／ポリスチレン担体、GDCは再生されることが可能である。これは微生物細胞の除去、洗浄および新しい生存可能な微生物細胞を有する担体の再装填により行われる。

#### 【0036】

所望の生変換相の後、溶液を回収相に持っていく。これはマンニトールに変換される全ての基質が消費される前に開始されてよい。低い基質濃度により生成力および／または収率が低下する場合、これは有利である。例えばこれは、エル・シュードメセンテロイズ (*L. pseudomesenteroides*) がフルクトースの変換に使用される場合である。上記消費されない基質の損失を避けるために、フルクトースは回収相で分離され、供給溶液をリコンディショニングするために変換段階に再循環される。

他の生物による汚染は、発酵において頻繁に問題となる。乳酸および酢酸の混合物はほとんどの微生物に対して抑制的である。これは、本発明において、回収

段階において酸を分離すること、およびそれらの部分を変換段階に再循環することにより、供給溶液の連続的なリコンディショニングを提供するために利用され得る。

### 【0037】

回収段階において、マンニトールは公知の技術により粗製生成物から変換段階後に直接結晶化され得る。複合材料が使用された場合、結晶化の前に色の除去が必要である。マンニトールは、連続的な生変換の間に、次の変換段階のための供給溶液をリコンディショニングするために、溶液から結晶化されてもよい。

存在する場合、他の糖類は、例えばクロマトグラフィーにより他の成分から分離され、変換段階に再循環され得る。

変換において生成された酸は、結晶化母液からクロマトグラフィーにより、例えばNa型カチオン交換樹脂を使用して、またはイオン交換技術を使用して分離され得る。あるいは母液は抗微生物剤として使用されてもよく、または連続的なリコンディショニングに関して上記されたように使用されてもよい。

### 【0038】

以下に、本発明について、限定されない例により説明する。

#### 実施例1

#### カラムリアクターにおける微生物の固定化

エル. シュードメセンテロイズ (*L. pseudomesenteroides*) (ATCC 1291) を貯蔵培養から以下の組成からなる成長培地に接種した。100g/l フルクトース、50g/l グルコース、2g/l イースト抽出物、2g/l トリプトン、2g/l  $K_2HPO_4$ 、0.01g/l  $MgSO_4$ 、0.01g/l  $MnSO_4$ 。

前記接種材料は一晩成長され、次いで2時間、担体が充填されたカラムを通して成長培地を再循環させることにより、細胞マスを殺菌された(70%エタノール)担体に転移した。該担体は弱塩基性アニオン交換体(Genenacor International Oyにより製造された、ポリスチレンと結合したDEAE変性セルロースのマイクロファイバーから製造された登録商標Spezyme GDC担体)であった。

### 【0039】

## 実施例2

## 攪拌リアクターにおける微生物の固定化

実施例1と同様の微生物細胞マスを使用した。微生物細胞マスは殺菌された担体を含むリアクターに添加され、微生物が担体に接着するまで、該混合物を2時間攪拌した。その後、リアクターは生変換のために準備された。

## 【0040】

## 実施例3

## pHおよび温度の調整による連続的なリコンディショニング

実施例1に従って提供されたカラム（ベット容積1リットル）を試験に使用した。無菌供給溶液（容積10リットル）を該カラムを通して再循環させた。供給溶液は以下の組成からなる。150 g/l フルクトース、50 g/l グルコース、1 g/l イースト抽出物、1 g/l トリプトン、0.01 g/l  $MgSO_4$ 、0.01 g/l  $MnSO_4$ 。再循環方向は、カラムの上部から底部であった。

供給溶液のpHおよび温度は、再循環容器において、生変換相の間に連続的に調整された。温度は約25℃に調整され、pHは連続的なNaOH（16%）の添加により5.0に調整された。

カラム中の供給速度は一定値に維持され、カラム中における約6分間の保持が提供された。

43時間の全工程時間後、供給溶液の組成は分析され、127 g/l マンニトール、32 g/l D-ラクテート、22 g/l アセテート、2 g/l フルクトースおよび0.3 g/l グルコースを含むことがわかった。カラム容積に対する平均容積マンニトール生成速度は30 g/l hであると算出された。フルクトースからのマンニトール収率は約85%であった。

溶液は60%乾燥物質含有量までエバポレーションされ、溶液を32℃まで徐々に冷却することにより、マンニトールを溶液から再結晶させた。

## 【0041】

## 実施例4

## 栄養素供給の調整による連続的なリコンディショニング

1回目の変換溶液を再循環容器からマンニトール回収へ排出された後、実施例3の再循環されたバッチ法を繰り返した。実施例3で使用されたものと同じ組成を有する新しい供給溶液で再循環容器は補充された。

2回目の変換後の変換溶液は、1回目の工程で得られたものとほとんど異ならない組成を有していた。

pHを調整するNaOHは消費される速度により測定された変換速度が境界値以下に減少するまで、同じ方法で供給溶液の新しいバッチを変換した。

境界値が10g/lhとなったら、バッチを3ないし4工程に関して繰り返した。その後、カラムの微生物は、100g/lフルクトース、50g/lグルコース、2g/lイースト抽出物、2g/lトリプトン、2g/l  $K_2HPO_4$ 、0.01g/l  $MgSO_4$ および0.01g/l  $MnSO_4$ を含む富栄養素溶液を、カラムを通して、pH調整NaOH消費速度が所望のレベルまで増加するまで（約3ないし4時間）、循環させることにより回復された。その後、実施例3による変換のために、カラムを再び使用した。

#### 【0042】

##### 実施例5

種々の原料からのマンニトール製造

実施例3記載の全工程を使用することにより、種々の原料から、種々の担体材料を使用して、再循環された、充填されたカラムリアクターにおいてマンニトールを製造した。使用された微生物はエル・シュードメセンテロイズ (*L. pseudomesenteroides*) (ATCC 12291)であった。全ての担体および原料は加工条件下でマンニトールを製造した。

本試験の原料および担体は以下の通りである。

#### 表1

【表1】



原料	担体
純粋なフルクトース・グルコース混合物 (3 : 1)	GDC (DEAE)
同上	GDC (COO <sup>-</sup> )
同上	ガラスビーズ
同上	ノートン触媒
変換酵素により完全に転化されたビート糖蜜 (糖 50 g / l)	GDC (DEAE)
同上	ガラスビーズ
グルコース / フルクトース (40 / 60) に異性化された グルコース (50 g / l)	GDC (COO <sup>-</sup> )
同上	ノートン触媒

使用された担体材料は、

GDC (DEAE) = 登録商標 Spezyme GDC、Genenocor International Oy に  
より製造された弱塩基性アニオン交換体  
GDC (COO<sup>-</sup>) = Cultor Ltd. による弱酸性カチオン交換体試験製品  
ノートン触媒 = Norton Chemical Product Corporation からの触媒担体、S A  
5203 1 / 8”

【0043】

実施例 6

種々の担体材料によるマンニトール製造

40 g / l フルクトース含有 MRS 培養液において担体材料の存在下、培養に  
よりエル、シュドメセンテロイズ (*L. pseudomesenteroides*) は種々の担体材  
料に固定化された。担体材料の濃度は 40 g / l であり、振動フラスコにおける  
培養は 25℃ で、振動速度 100 rpm で 20 時間続けられた。結合した細胞を  
有する担体材料は培養液から分離され、カラムに充填された。

マンニトールの製造は、カラムを通して 10 g / l グルコース、30 g / l  
フルクトース、2 g / l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2 g / l NaH<sub>2</sub>-シトレートお  
よび 3 g / l 酢酸を含む溶液の循環により行われた。pH は NaOH により p  
H 5.2 まで調整された。3 時間循環後に採取された試料から HPLC によりマ

ンニトールは分析された。

担体材料は、登録商標Spezyme GDC、ノートン触媒、ガラスビーズ(Schott beads, SIRAN担体, SIKUG 023/02/B, Schott Engineering)、活性炭(粒子化活性炭、Chemviron CPG)、Amberlite IRA 93(弱塩基性アニオン交換体、Rohm & Haas)およびGDC(COO-)であった。

#### 【0044】

##### 実施例7

種々の固定化微生物によるマンニトール製造

実施例6でエル、シュードメセンテロイズ(L. pseudomesenteroides)に関して記載されたように、エル、ブレビス(L. brevis)(VTTE-91458)をノートン触媒に固定化した。

68時間、振動フラスコにおいて、28℃で250rpmの振動速度で培養することにより、30g/lスクロースおよび5g/lイースト抽出物ならびに40g/l登録商標Spezyme GDCを含むCrapek培養液中で、アスペルギルスカンジダス(Aspergillus candidus)(NRRL305)は固定化された。培養された細菌が固定化された担体材料は、培養液からろ過により収穫した。

同様の方法で、YM培養液を使用してザイゴサッカロマイセスロウクシイ(Zygosaccharomyces rouxii)(ATCC 12572)を登録商標Spezyme GDC上に固定化し、ATCC培養液466を使用してカンジダベルサチリス(Candida versatilis)(ATCC 20221)および(ATCC 20223)をガラスビーズ上に固定化した。

許容され得るレベルにおける短期間のマンニトール製造が、以下の生成培地により、固定化材料により認められた。

エル、ブレビス(L. brevis): 30g/lフルクトース、10g/lグルコース、2g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 5.2へ連続的に調整

エー、カンジダス(A. candidus): 100g/lグルコース、1g/lイースト抽出物、0.5g/l NaNO<sub>3</sub>; pH 7.3へ連続的に調整

ゼット、ロウクシイ(Z. rouxii): 200g/lグルコース、1g/lイースト抽出物、0.5g/l尿素; pH調整なし

シー、ベルサチリス(*C. versatilis*): 200 g/l グルコース、1 g/l  
イースト抽出物、2 g/l  $K_2HPO_4$ ; pH 5.5へ連続的に調整

【0045】

#### 実施例8

##### マンニトールの結晶化

本発明の方法に従って得られた、ろ過したマンニトール溶液を結晶化させた。乾燥物質を基準として約6.3%マンニトールを含む希釈マンニトール溶液はエバポレーションされ、約4.8重量%の濃度とされた。得られた溶液は約4.5℃の温度まで冷却され、自発的な結晶化により種付けされる。結晶化されたマンニトールのマスは約12時間で、約3.2℃の温度まで冷却された。結晶は遠心分離により母液から分離され、乾燥された。遠心分離において乾燥物質を基準として約50%の洗浄水が使用され、結晶は4.0℃でオープンで乾燥された。

マンニトール収率は乾燥物質を基準として約2.5%、遠心分離後マンニトールを基準として約4.0%であった。

【0046】

#### 実施例9

##### 母液からのマンニトール分離

マンニトールは実施例8にしたがって変換溶液から結晶化され、結晶は遠心分離により母液から分離された。まだ母液に残存しているマンニトールを精製するために、溶液のクロマトグラフィー分離を行った。分離はバッチ法で、クロマトグラフィー分離カラムにおいて行われた。

分離カラムは強酸性カチオン交換樹脂(Finex Oy, フィンランドにより製造されたもの)で充填され、浸水された。樹脂の架橋度は6.0% DVBであり、平均粒子サイズは約0.35 mmであった。樹脂はNaCl溶液によりNa<sup>+</sup>型に再生された。

分離の前に、供給溶液はろ過され、乾燥物質(DS)含有量は30 g/100 gに調整された。供給溶液のpHは水酸化ナトリウムによりpH 5.5まで調整された。加工温度は80℃まで調整され、カラム中の展開水の一次流速は約0.5 m/hであった。

伝導性、pH、屈折乾燥物質（RDS）ならびに残渣および生成フラクションの組成（HPLCによる）を分析した。フラクションおよび供給溶液の組成を表2に示す。フラクションはHPLCにより分析された。

表2

フラクション、供給溶液の組成およびマンニトール収率

【表2】

	供給溶液	残渣 フラクション	生成 フラクション
RDS, g/100g	30	6.5	7
マンニトール, DS%	48.5	5	90
グルコース, DS%	0.4	—	0.8
フルクトース, DS%	1.8	—	3.5
酢酸, DS%	19	56.5	2.8
乳酸, DS%	29	37	2
マンニトール収率, %		5	95

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年9月28日(2000. 9. 28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マンニトールに変換可能な基質をマンニトールに変換するのに適当な条件下で、前記基質を含む溶液を供給し、粒子中および／または上に固定化された生存可能なマンニトール形成微生物細胞を含む固体担体粒子に接触させること、

いくつかの別個の連続的な変換段階において前記基質を変換させること、

前記基質の大部分をマンニトールに変換するために、連続的な変換段階の間に前記溶液をリコンディショニングすること、ならびに

マンニトールおよび所望により変換副産物を回収すること  
を特徴とする、固定化微生物の助力による生変換によりマンニトールを製造する方法。

【請求項2】 前記溶液の前記リコンディショニングが、連続的なpH、温度、供給速度、基質含有量、補基質含有量、栄養素供給または圧力の調整、変換生成物または他の固体もしくは液体成分の除去、あるいは前述のいずれかの組み合わせからなることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記リコンディショニングが前記溶液の一部で行われるか、または前記溶液の種々の部が種々のリコンディショニング段階を受けることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 前記基質がフルクトースからなることを特徴とする請求項1ないし3記載の方法。

【請求項5】 前記変換が、前記溶液中のフルクトースの少なくとも70%、好ましくは80%ないし90%またはそれより多くがマンニトールに変換される

まで行われることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記担体粒子が多孔性、実質的に非圧縮性材料であることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項7】 前記方法が、前記担体により充填されたカラムの1本もしくはそれより多くにおいて連続的に行われる連続的な変換方法であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項8】 前記溶液が前記カラムの1本もしくはそれより多くを通して再循環されることを特徴とする請求項6または7記載の方法。

【請求項9】 前記溶液が一連の前記カラムを通して連続的に供給されることを特徴とする請求項6または7記載の方法。

【請求項10】 前記担体が、多孔性ガラスビーズ、多孔性シリケートビーズまたは活性炭のような不活性材料からなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項11】 前記担体が、実質的に非圧縮性の多孔性粒子状固体材料の形態の弱塩基性アニオン交換基材、好ましくはポリスチレンとの凝集により接着結合したジエチルアミノエチル (DEAE) 変性セルロースを含む弱塩基性アニオン交換体からなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項12】 前記微生物が、ロイコノストク シュードメセンテロイズ (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)、アスペルギルス カンジダス (*Aspergillus candidus*)、ザイゴサッカロマイセス ロウクシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*)、カンジダ ベルサチリス (*Candida versatilis*)、ラクトバシルス フェルメントム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバシルス セロビオサス (*Lactobacillus cellobiosus*)、ラクトバシルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバシルス ブチネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ロイコノストク メセンテロイズ (*Leuconostoc mesenteroides*) およびロイコノストク オエノス (*Leuconostoc oenos*) からなる群から選択されることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項13】 前記微生物がロイコノストク シュードメセンテロイズ (*Leuconostoc pseudomesenteroides*) (ATCC 12291) であることを特徴

とする請求項11記載の方法。

【請求項14】 前記リコンディショニングが、前記溶液のpHを約4以上の値まで、好ましくはpH4.5および6.5の間に、最も好ましくは約pH5まで調整することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項15】 アルカリヒドロキシドまたはアンモニウムヒドロキシドのような塩基を添加することにより、あるいは緩衝物質を添加することにより前記溶液のpHが調整されることを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項16】 変換の間に形成された酸を除去することにより前記溶液のpHが調整されることを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項17】 前記溶液の圧力を減少することにより、変換の間に生成された二酸化炭素の溶解により形成されたカルボン酸を除去することを中心とする請求項16記載の方法。

【請求項18】 前記リコンディショニングが、前記溶液の温度を約20ないし35℃、好ましくは25ないし30℃の値まで調整することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項19】 前記リコンディショニングが、前記溶液の体積流量速度を時間当たり約2ないし20ベッド容積、好ましくは時間当たり約10ないし20ベッド容積の値まで調整することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項20】 前記リコンディショニングが、前記溶液の基質フルクトース含有量を約7ないし200g/l、好ましくは約15ないし160g/l、最も好ましくは約50ないし150g/lまで調整することからなることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項21】 前記リコンディショニングが、前記溶液の補基質含有量を約4ないし100g/l、好ましくは約8ないし80g/l、最も好ましくは約25ないし75g/lまで調整することからなることを特徴とする請求項20記載の方法。

【請求項22】 前記リコンディショニングが、固定化微生物細胞の微生物

活性を断続的に回復させるために前記溶液に栄養素を添加することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項23】 前記栄養素がイースト抽出物、トリプトン、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、マグネシウムスルフェート、マンガンスルフェートおよびそれらの混合物から選択されることを特徴とする請求項20または21記載の方法。

【請求項24】 前記リコンディショニングが、連続的な変換段階の間にマンニトールを回収することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項25】 前記リコンディショニングが、最終マンニトール回収後に母液に残存する基質をいずれも前記溶液に戻すことからなることを特徴とする請求項24記載の方法。

【請求項26】 前記リコンディショニングが、クロマトグラフィーおよび／またはイオン交換により前記溶液から酸を回収することからなることを特徴とする請求項24記載の方法。

【請求項27】 前記リコンディショニングが、前記母液または前記回収された酸の少なくとも一部を前記溶液に戻すことからなることを特徴とする請求項23または25記載の方法。

【請求項28】 前記リコンディショニングが、ろ過、沈殿、抽出、メンブレフィルター、電気透析および分別蒸留から選択された方法の一種またはそれより多くにより、前記溶液に含まれる固体または液体成分を除去することからなることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項29】 前記リコンディショニングが、前記変換において10g／1h以上の、好ましくは30および40g／1hの間のマンニトールの容積生成力をもたらすようにモニターされることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項30】 前記カラムにおけるマンニトールの容積生成力が予め決められた境界値まで減少するまで、前記溶液が前記カラムを通して再循環させることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項31】 前記溶液が補基質としてグルコースのような同化性ヘキシ



ース糖、またはヘキソース糖に加水分解可能なオリゴーもしくはポリーサッカリド、あるいはそれらの混合物を含むことを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項32】 前記供給溶液がフルクトースおよびグルコースの混合物を含むことを特徴とする請求項31記載の方法。

【請求項33】 前記供給溶液が異性化グルコース、転化糖蜜、ビートまたはサトウキビ糖蜜、それらの希薄もしくは濃厚ジュースあるいはフラクションからなることを特徴とする請求項32記載の方法。

【請求項34】 前記溶液におけるグルコースが、該方法において、同時に、または別々に、好ましくは連続的に、酵素的に異性化されることを特徴とする請求項32記載の方法。

【請求項35】 前記溶液が、マンニトールに変換可能な前記基質としてグルコースまたはマンノースを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項36】 前記担体が、微生物細胞の除去、洗浄および新しい生存可能な微生物細胞による再装填により再生されることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項37】 マンニトールが、最終変換された溶液から結晶化により回収されることを特徴とする前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項38】 マンニトール分離後、母液に含まれる乳酸および／または酢酸をクロマトグラフィーおよび／またはイオン交換により回収することを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項39】 請求項1ないし38のいずれか一つに記載の方法により得られる母液を、食品添加剤、動物飼料または動物飼料添加剤として使用すること。

## 【国際調査報告】

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FI 99/00573

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC5: C12P 7/18, C12N 11/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
IPC5: C12P, C12N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
SE, DK, FI, NO classes as above				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	Agro-Food-Industry Hi-Tech, January/February 1995, W. Soetaert et al: "Production of D-mannitol and D-lactic acid by fermentation with <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> ", page 41 - page 49 --	1-39		
X	NATO ASI Series A. Life Sciences, Volume 207, 1991, W. Soetaert et al, "PRODUCTION OF MANNITOL BY LEUCONOSTOC MESENTEROIDES, IMMOBILIZED ON RETICULATED POLYURETHANE FOAM" page 249 - page 250 --	1-39		
X	Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, Volume 55, No 4, 1990, W. Soetaert, "PRODUCTION OF MANNITOL WITH <i>Leuconostoc mesenteroides</i> " page 1549 - page 1552 --	1-39		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td>           * Special categories of cited documents:            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier document but published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or state special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td>           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "Z" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or state special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or state special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
10 November 1999		15 - 11 - 1999		
Name and mailing address of the ISA: Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Hampus Rystedt/E0 Telephone No. +46 8 782 25 00		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 98/00573

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9704120 A1 (CULTOR OY), 6 February 1997 (06.02.97), see abstract, page 4, line 18 - page 6, line 14, claims --	1-39
A	DE 4410028 A1 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MEH), 2 November 1995 (02.11.95), see esp. page 3, line 48 - line 51, page 4, line 63 - page 5, line 9 and fig. 1 --	1-39
A	DE 3715857 A1 (FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG EV), 1 December 1988 (01.12.88), see esp. column 7, lines 10-46 and fig. 1 --	1-39
A	JP 60002191 A (SHINNENRYOYU KAIHATSU GIJUTSU), 1985-01-08 (abstract) World Patents Index (online). London, U.K.: Derwent Publications, Ltd. (retrieved on 1999-11-10). Retrieved from: EPO WPI Database. DW198507, Accession no. 1985-042144: JP 60002191 (SHINNENRYOYU KAIHATSU GIJUTSU KENKIYU KUMIAI) 1985-05-11 (abstract). (online) (retrieved on 1999-11-10). Retrieved from: EPO PAJ Database -- -----	1-39

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Information on patent family members

28/09/99

International application No.

PCT/FI 99/00573

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9704120 A1	06/02/97	AU 6460196 A	18/02/97
		EP 0839209 A	06/05/98
		FI 100338 B	00/00/00
		FI 953480 A	19/01/97
		US 5932455 A	03/08/99
DE 441002B A1	02/11/95	NONE	
DE 3715857 A1	01/12/88	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	J-コード (参考)
C 12 R 1:01)		C 12 R 1:01)	
(C 12 P 7/18		(C 12 P 7/18	
C 12 R 1:66)		C 12 R 1:66)	
(C 12 P 7/18		(C 12 P 7/18	
C 12 R 1:72)		C 12 R 1:72)	
(C 12 P 7/18		(C 12 P 7/18	
C 12 R 1:225)		C 12 R 1:225)	
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72) 発明者			
Fターム(参考)	2B150 AC01 AC06 AC15 AC16 AC24 AC27 DD26 DD31 4B033 NA01 NA12 NA14 NB13 NB40 NB45 NB68 NC04 ND02 4B035 LE03 LG05 LP42 4B064 AC09 CA02 CA06 CA35 CA40 CB18 CC03 CC07 CD09 CE15 DA10 DA11		